製品コード RR041A

TaKaRa

SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time)

説明書

v201108Da

SYBR® *Premix Ex Taq*（Perfect Real Time）は、SYBR® Green I ＊1 を用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR 専用試薬です。2 ×濃度のプレミックスタイプ試薬で、リアルタイムモニタリングに適した濃度の SYBR® Green I をあらかじめ含んでおり、反応液の調製が簡単です。
本製品では、ホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS と最適化されたバッファーの組み合わせにより、非特異的増幅を抑制し、高い増幅効率でリアルタイム PCR を行うことができます。また、高速タイプのリアルタイム PCR 装置にも対応しており、短時間での反応が可能です。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System（製品コード TP800/TP850 など）＊2
- Smart Cycler® System ＊3/Smart Cycler® II System ＊3（Cepheid 社）
- ABI PRISM® 7000/7700、Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）
- LightCycler®（Roche Diagnostics 社）
- Mx3000P™（Agilent Technologies 社）など

＊1：Molecular Probes Inc. より研究用試薬として SYBR® Green I ライセンスを受けています。SYBR® は Molecular Probes Inc. の登録商標です。
＊2：Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（ 製品コード TP900/TP960）には SYBR® *Premix Ex Taq* II（製品コード RR820A/B、RR081A/B）の使用を推奨します。
＊3：Smart Cycler® は Cepheid 社の登録商標です。

I. 原理

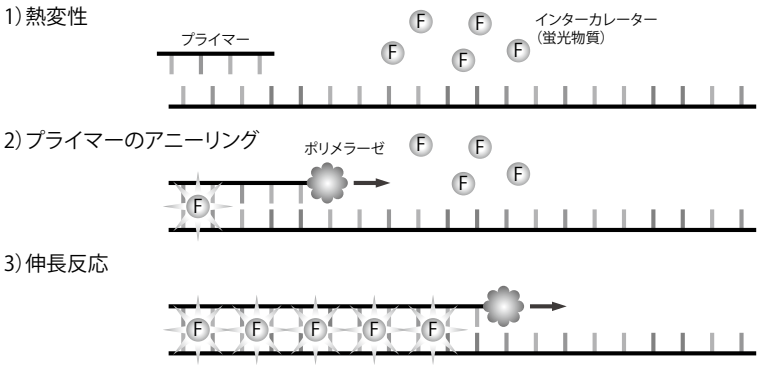
本製品では、*TaKaRa Ex Taq* HS による PCR 増幅を行います。PCR 増幅産物は、SYBR® Green I によりリアルタイムでモニタリングできます。

1. PCR

PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることが出来ます。
本製品では、増幅に Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. 蛍光検出法

インターカレーター法
二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR® Green I など）を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。
ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。この蛍光強度を検出することで、定量だけでなく増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。



II. 内容［200 回（50 μl 反応系）］

SYBR® *Premix Ex Taq*（Perfect Real Time）（2 × conc.）＊1	1 ml × 5 本
ROX Reference Dye（50 × conc.）＊2	200 μl
ROX Reference Dye II（50 × conc.）＊2	200 μl

＊1：*TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg^{2+}および SYBR® Green I を含む。

＊2：Life Technologies 社製リアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。ABI PRISM® 7000/7700 や 7300 Real-Time PCR System には ROX Reference Dye を、7500 Real-Time PCR System および 7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を用いてください。
Mx3000P™の場合には、ROX Reference Dye II が適しています。
Thermal Cycler Dice Real Time System や Smart Cycler® System、LightCycler® では必要ありません。

本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー＊
4. 滅菌蒸留水
5. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

＊：リアルタイム PCR 用プライマーの設計方法は、「VII.（1）プライマー設計について」をご参照ください。ヒト、マウス、ラット、ラット、ウシ、ニワトリ遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、当社のオンライン検索＆注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】のご利用を推奨致します。
（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

III. 保存

4℃保存：6 ヶ月安定
必ず遮光してください。また、コンタミネーションには十分注意してください。

＊ 本製品はドライアイス直付けでお届けします。受け取り後､4℃で遮光保存してください。
＊ 長期保存する場合は、－ 80℃で保存してください。（－ 20℃保存は避けてください。）
いったん融解したものは 4℃保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。

IV. 特長

（1） リアルタイム PCR により、遺伝子の検出、定量を迅速かつ正確に行うことが可能です。

（2） SYBR® Green I があらかじめミックスしてある 2 × conc. のプレミックス試薬です。プライマーとテンプレートと滅菌蒸留水を加えるだけでインターカレーター法によるリアルタイム PCR を行うことができます。

（3） PCR には、Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を用いています。バッファー系はリアルタイム PCR 用に至適化されているため、増幅効率が良く、高感度な検出ができます。

V. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1） 使用時には、泡立てないよう緩やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。
ボルテックスによる混合は行わないでください。

なお、SYBR® *Premix Ex Taq*（2×conc.）を－ 80℃保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿を生じることがあります。軽く手で温めるか、遮光して室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。
沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、必ず均一に混合してからご使用ください。

（2） 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。

（3） 本製品は SYBR® Green I を含んでいます。反応液調製時に強い光をあてないよう注意してください。

（4） 反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

VI. 操作

＜ Thermal Cycler Dice Real Time System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。
＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2 ×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
template（＜ 100 ng）	2 μl	＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl	
Total	25 μl ＊3	

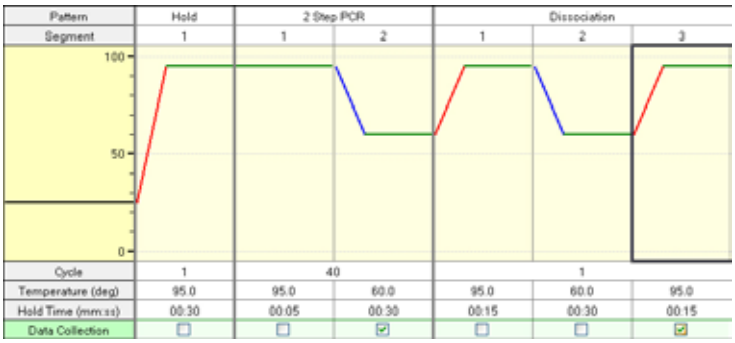
＊ 1：最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

＊ 3：反応液量は 25 μl を推奨。

2. 反応を開始する。
PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（詳しくは、11 ページの「実験条件の選び方」をご確認ください。

シャトル PCR 標準プロトコール



Hold（初期変性）
Cycle：1
95℃　30 秒

2 Step PCR
Cycle：40
95℃　5 秒
60℃　30 秒

Dissociation

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
Thermal Cycler Dice Real Time System での解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System 取扱説明書を参照してください。

＜ ABI PRISM® 7000/7700 および Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法＞

※ 各機種の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2 ×）	10 μl	25 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ＊1
ROX Reference Dye（50 ×）or Dye II（50 ×）＊3	0.4 μl	1 μl	1 ×
template	2 μl	4 μl	＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	6.8 μl	18 μl	
Total	20 μl ＊4	50 μl ＊4	

＊ 1：最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。20 μl あたり DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

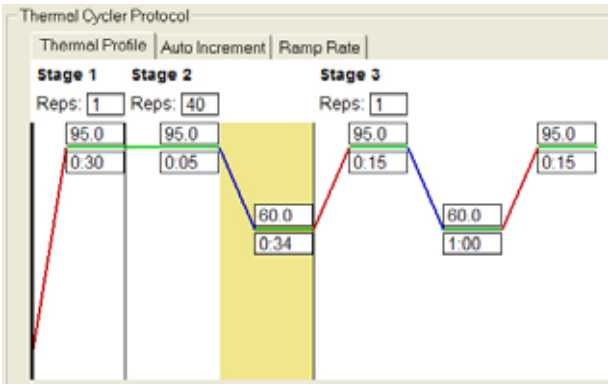
＊ 3：ROX Reference Dye II（50×）は、ROX Reference Dye（50×）より濃度が低く設定されています。7500 Real-Time PCR System および 7500 Fast Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II（50×）の使用を推奨します。

なお、ABI PRISM® 7000/7700 および 7300 Real-Time PCR System には、ROX Reference Dye（50 ×）を使用してください。

＊ 4：各装置の推奨容量に従って調製する。

2. 反応を開始する。
PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（詳しくは、11 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。）

＜ ABI PRISM® 7000/7700、7300/7500 Real-Time PCR System ＞



シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
　Reps：1
　95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
　Reps：40
　95℃　5 秒
　60℃　30 秒～ 34 秒＊
Stage 3：Melt Curve

＊：7700 では 30 秒に、7000 および 7300 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定する。

＜ 7500 Fast Real-Time PCR System ＞

シャトル PCR 標準プロトコール

Holding Stage
　Reps：1
　95℃　30 秒
Cycling Stage
　Number of Cycles：40
　95℃　3 秒
　60℃　30 秒
Melt Curve Stage

※使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

＜ Smart Cycler® II System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。
＜ 1 反応あたり＞

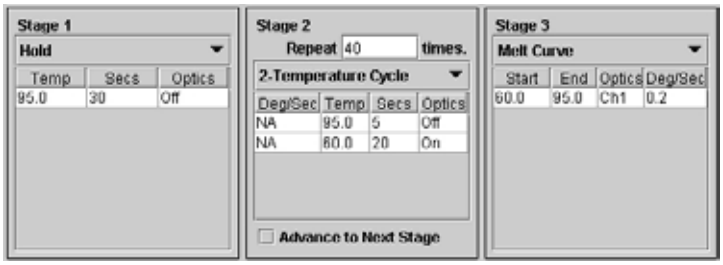
試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2 ×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
template（＜ 100 ng）	2 μl	＊2
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl	
Total	25 μl	

＊ 1：最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

2. 反応チューブを Smart Cycler® 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler® にセットし、反応を開始する。
PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（詳しくは、11 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。）

シャトル PCR 標準プロトコール



Stage 1：初期変性
Hold
95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
Repeat：40 times
95℃　5 秒
60℃　20 秒
Stage 3：Melt Curve

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
Smart Cycler® System での解析方法は、Smart Cycler® System 取扱説明書と VII. 反応例を参照してください。

＜ LightCycler® を用いる場合の操作方法＞

※ LightCycler®（Roche Diagnostics 社）の取扱説明書に従って操作してください。

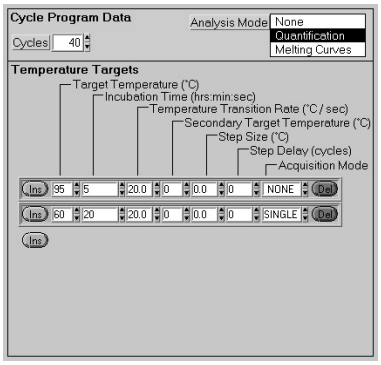
1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。
＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2 ×）	10 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊ 1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊ 1
template（＜ 100 ng）	2 μl	＊ 2
dH_2O（滅菌蒸留水）	7.2 μl	
Total	20 μl	

＊ 1： 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

2. PCR キャピラリーを遠心機で軽く遠心後、LightCycler® にセットし、反応を開始する。
PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（PCR 条件を至適化する場合は、11 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。）



Stage 2：PCR 反応

シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
95℃　30 秒　20℃ / 秒
1 サイクル

Stage 2：PCR 反応
95℃　5 秒　20℃ / 秒
60℃　20 秒　20℃ / 秒
40 サイクル

Stage 3：融解曲線分析
95℃　0 秒　20℃ / 秒
65℃　15 秒　20℃ / 秒
95℃　0 秒　0.1℃ / 秒

※使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

＜ Mx3000P™を用いる場合の操作方法＞

※ Mx3000P™（Stratagene 社）の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。
＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2 ×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
ROX Reference Dye II（50×）＊2	0.5 μl	1 ×
template（＜ 100 ng）	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	9 μl	
Total	25 μl	

＊1： 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊2： ウェル間の補正には、ROX Reference Dye II（50×）を使用する。ROX Reference Dye（50 ×）は濃度を高く設定しているため、Mx3000P™での使用には適さない。

＊3： template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

2. 反応を開始する。
PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。（PCR 条件を至適化する場合は、11 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。）

シャトル PCR 標準プロトコール
Segment 1：初期変性
95℃　30 秒
1 サイクル
Segment 2：PCR 反応
95℃　5 秒
60℃　20 秒
40 サイクル
Segment 3：Dissociation Curve

※使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照してください。

実験条件の選び方

推奨条件（シャトル PCR 標準プロトコール）で良好な反応性が得られない場合には、下記の要領でプライマー濃度や PCR 条件の検討を行ってください。また、反応系によっては、特性が異なる他の Perfect Real Time シリーズリアルタイム PCR 試薬（製品コード RR820/RR081/RR091）を用いることにより、反応性が大きく改善することもあります。
実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。

○ 反応特異性が高い実験系
- No Template Control でプライマーダイマーなどの非特異的増幅が生じない。
- 目的産物以外の非特異的増幅が生じない。

○ 増幅効率が高い実験系
- 増幅産物がより早いサイクルで検出される（Ct 値が小さい）。
- PCR 増幅効率が高い（理論値である 100%に近い）。

【プライマー濃度の検討】
プライマー濃度と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるにはプライマー濃度を下げ、増幅効率を上げるにはプライマー濃度を上げます。

（プライマー濃度）	低濃度（0.1 μM）	高濃度（1.0 μM）	
反応特異性	高い ←		低い
増幅効率	低い	→	高い

【PCR 条件の検討】
○ 反応特異性を上げるには―
アニーリング温度を上げると反応特異性が改善することがあります。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。

[シャトル PCR] 標準プロトコール	→	アニーリング温度を上げる
95℃ 5 秒 60℃ 30 秒		95℃ 5 秒 ～ 64℃ 30 秒

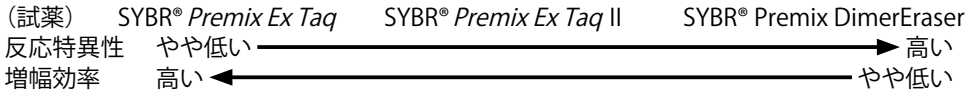
○ 増幅効率を上げるには―
伸長時間を延ばすか、3 step PCR に変更することにより、増幅効率が改善することがあります。以下の手順で検討を行ってください。

[シャトル PCR] 標準プロトコール	→	伸長時間を延ばす	→	[3 step PCR]	→	伸長時間を延ばす
95℃ 5 秒 60℃ 30 秒		95℃ 5 秒 60℃ 1 分～		95℃ 5 秒 55℃ 30 秒 72℃ 30 秒		95℃ 5 秒 55℃ 30 秒 72℃ 1 分～

○初期変性について
初期変性は通常 95℃、30 秒で充分です。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鋳型でも、ほとんどの場合、この条件で良好に反応できます。鋳型の状態によっては、95℃、1 ～ 2 分程度に延長することが可能ですが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがありますので、2 分以上の条件は推奨しません。

【試薬と反応性の関係】

タカラバイオでは SYBR® Green Assay 用のリアルタイム PCR 試薬として 3 種類の製品を販売しており、それらの試薬と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。SYBR® *Premix Ex Taq*（Perfect Real Time）（製品コード RR041）は増幅効率が高い試薬ですが、反応特異性を上げるには、SYBR® *Premix Ex Taq* II（Perfect Real Time）（製品コード RR081）や SYBR® *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820）、SYBR® Premix DimerEraser（Perfect Real Time）（製品コード RR091）の使用が有効です。



VII. Appendix

（1）プライマー設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーを設計することが重要です。以下のガイドラインに沿って、増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計してください。

なお、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、当社オンライン検索 & 注文システム【Perfect Real Time サポートシステム】＊のご利用を推奨致します。

（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

＊：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本キットと組合せて、SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

本システムを利用して RT-PCR プライマーを設計・合成された場合には、シャトル PCR 標準プロトコールで反応できます（P. 5 ～ 10 参照）。

■増幅産物

増幅サイズ	80 ～ 150 bp が最適（300 bp までは増幅可能）

■プライマー

長さ	17 ～ 25 mer
GC 含量	40 ～ 60%（望ましくは、45 ～ 55%）
Tm	Forward primer と Reverse primer の Tm 値が大きく異ならないこと。 Tm 値の計算は、専用のソフトウエアで行う。 OLIGO ＊1：63 ～ 68℃ Primer3 ＊2：60 ～ 65℃
配列	全体的に塩基の偏りがない配列にする。 部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける（特に 3' 末端）。 T/C の連続（polypyrimidine）は避ける。 A/G の連続（polypurine）は避ける。
3' 末端配列	3' 末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける。 3' 末端塩基は、G または C が望ましい。 3' 末端塩基が T であるプライマーは避けたほうがよい。
相補性	プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける。 プライマーの 3' 末端同士が 2 base 以上相補する配列を避ける。
特異性	BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する＊3。

＊1：OLIGO™ Primer Analysis Software（Molecular Biology Insights 社）
＊2：Primer3（http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/）
＊3：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

※ タカラバイオ（株）では、【Perfect Real Time サポートシステム】に対応していない遺伝子についても、プライマーのカスタム設計・合成サービスを行っております。
詳細は、弊社販売課までお問い合わせください。
（東日本販売課：TEL 03-3271-8553、西日本販売課：TEL 077-543-7297）

（2）RT-PCR を行う場合

RT 反応には PrimeScript RT キットシリーズ（製品コード RR037A/B、RR036A/B、RR047A/B）の使用をお勧めします。本製品と組み合わせて使用することにより、信頼性の高い結果を得ることができます。以下には PrimeScript RT reagent Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR037A）を用いた例を示します。

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。
RNA サンプル以外のコンポーネントを必要な本数＋ α 調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
5 × PrimeScript® Buffer（for Real Time）	2 μl	1 ×
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer（50 μM）＊1	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）＊1	0.5 μl	50 pmol
total RNA		
RNase Free dH_2O		
Total	10 μl ＊2	

＊1：Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下の通りです。

プライマー	使用量	添加量
Oligo dT Primer（50 μM）	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers（100 μM）	0.5 μl	50 pmol
Gene Specific Primer（2 μM）	0.5 μl	1 pmol

＊2：逆転写反応は、必要に応じてスケールアップしてください。10 μl の反応液で逆転写出来るのは、およそ 500 ng までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。
37℃、15 分＊3　（逆転写反応）
85℃、5 秒　（逆転写酵素を熱失活させる）
4℃

＊3：Gene Specific Primer を用いる場合：
逆転写反応を 42℃、15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50℃に変更すると改善される場合があります。

3. PCR 反応液を下記の通り調製する。（Smart Cycler® System 使用の場合）
以下のコンポーネントを必要本数＋α調製し、22.5 ～ 24 μl ずつ分注する。

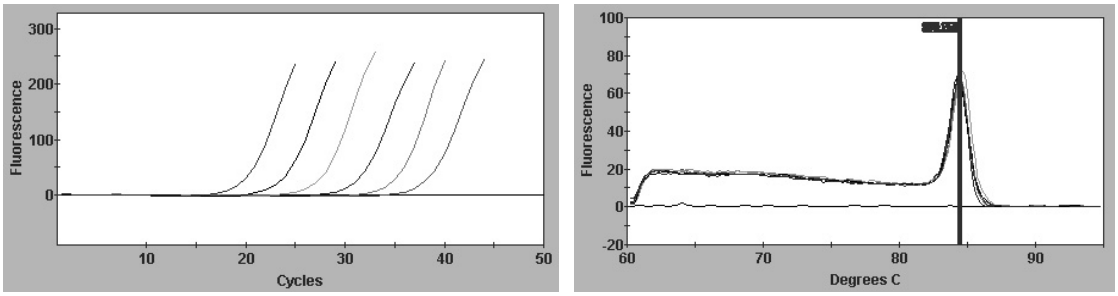
＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
SYBR® *Premix Ex Taq*（2 ×）	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM
dH_2O（滅菌蒸留水）	x μl	
Total	22.5 ～ 24 μl	

4. 反応液を分注したチューブに逆転写反応液を 1 ～ 2.5 μl 添加する。＊

＊：PCR 反応への逆転写反応液の持込み量は、2.5 μl 以下にしてください。

■反応例



RT-PCR により Human GAPDH mRNA を検出した。total RNA 1 pg ～ 100 ng 相当量の cDNA および Negative Control として dH_2O を鋳型とした。

VIII. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™ 5 mL/25 mL（製品コード RR041L/W）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ 5 mL/25 mL, ROX plus（製品コード RR41LR/WR）
SYBR® *Premix Ex Taq* ™ (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq* ™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II（Perfect Real Time）（製品コード RR081A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 5 mL/25 mL（製品コード RR081L/W）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 5 mL/25 mL, ROX plus（製品コード RR81LR/WR）
SYBR® Premix DimerEraser®（Perfect Real Time）（製品コード RR091A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR037A/B）
PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）
One Step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR096A/B）
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II（Perfect Real Time）（製品コード RR086A/B）
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR066A）
Premix Ex Taq®（Probe qPCR）（製品コード RR390A/B）
One Step PrimeScript® RT-PCR Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR064A）

Smart Cycler® II System（製品コード SC200N/SC210N）
Smart Cycler® Software Version 2.0 Upgrade Kit（製品コード SC220）

Perfect Real Time サポートシステム＊
（http://www.takara-bio.co.jp/realtime/）

＊：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリの RefSeq に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本キットと組合せて、SYBR® Green I 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

IX. 参考文献

1）吉崎美和 , 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ、120-126
2）吉崎美和 , 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 , 39-43

X. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- SYBR は Molecular Probe Inc. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている商品名などは、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[P5] PCR Notice
Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,994,056 and 6,171,785. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[L11] SYBR® Green I
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,436,134 and 5,658,751 and their foreign counterpart patent claims.
Takara PCR products containing SYBR® Green I are sold under license from Molecular Probes Inc. only for the usage in Real-time PCR for internal research purpose. These products are not to be used for the purpose such as; providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis or screening services or providing clinical information or clinical analysis in return for compensations.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L46] SYBR/Melting Curve Analysis
The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary in vitro diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, owned by the University of Utah Research Foundation or Evotec Biosystems GmbH and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH, to use only the enclosed amount of product according to the specified protocols. No right is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use any instrument or system under any claim of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, other than for the amount of product contained herein.

[L52] Rox Reference Dye (Research Field)
Purchase of this product includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased for the purchaser' s own internal research. No other patent rights are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 of U.S. Patent No. 5,436,149 and its foreign counterpart patent claims.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/
タカラバイオ株式会社